

24.01.00

PCT/NL 99 / 00786

09/868408

KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN



Bureau voor de Industriële Eigendom

REC'D 02 FEB 2000

WIPO PCT

Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 17 december 1998 onder nummer 1010833,  
ten name van:

**TECHNISCHE UNIVERSITEIT DELFT**

te Delft

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Werkwijze voor het gedoseerd aanbrengen van een vloeistof op een oppervlak",

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Rijswijk, 24 januari 2000.

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,  
voor deze,

I.W. Scheevelenbos - de Reus.

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

UITTREKSEL

De uitvinding betreft een werkwijze voor het gedo-  
seerd aanbrengen van een vloeistof op een gekozen deel van  
het oppervlak van een substraat door middel van verstuiven  
onder invloed van een elektrische spanning. Volgens de uit-  
5 vinding wordt de vloeistof met een debiet tussen 0,01 pl/s en  
1 ml/s naar een distaal uiteinde van een capillair met een  
inwendige diameter van minder dan 150  $\mu\text{m}$  gevoerd, waarbij de  
afstand tussen het distale uiteinde en het oppervlak minder  
dan 2 mm is. Verrassenderwijze is gebleken dat aldus vloei-  
10 stof op een beperkt oppervlak met een gedefinieerde grootte  
kan worden aangebracht.

NL 43860-A1/ho

Werkwijze voor het gedoseerd aanbrengen van een vloeistof op een oppervlak

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het gedoseerd aanbrengen van een vloeistof op een oppervlak van een substraat, waarbij de vloeistof naar een distaal uiteinde van een capillair wordt gevoerd, waarbij  
5 het distale uiteinde een naar het oppervlak gekeerd mondstuk omvat, en een de oppervlaktespanning van de vloeistof overwinnende spanning wordt aangelegd tussen het mondstuk en een tegenelektrode tot de gewenste hoeveelheid vloeistof op het gekozen deel van het oppervlak is aangebracht.

10 Een dergelijke werkwijze is bekend als "elektro-spraying" en wordt gebruikt voor het aanbrengen van een bekleding op een substraat. Zo beschrijft EP-A-0.258.016 een elektrostatisch bekledingssysteem geschikt voor het aanbrengen van een zeer dunne bekleding op een substraat, waarbij  
15 een bekledingsvloeistof door middel van een potentiaal verschil tot een mist van sterk geladen druppeltjes wordt verstoven, welke geladen druppeltjes naar het substraat worden getrokken. Door de qua teken gelijke lading van de druppeltjes stoten zij elkaar af waardoor het oppervlak in hoofdzaak  
20 egaal kan worden bedekt.

Verrassenderwijze heeft aanvraagster gevonden dat het met deze techniek mogelijk is om een klein gekozen deel (met een (grootste) diameter van 1 cm of minder) van het oppervlak van vloeistof te voorzien zonder dat een wezenlijke  
25 hoeveelheid vloeistof buiten dit gekozen deel terecht komt. Dit gebeurt ook niet bij langere aanbrengtijden. Dan vormt zich een druppel die geen verstoring van de werkwijze met zich mee blijkt te brengen.

Volgens de uitvinding kan een gekozen deel van het  
30 oppervlak van een substraat van vloeistof worden voorzien door de vloeistof naar het distale uiteinde van het capillair te voeren met een debiet tussen 0,01 pl/s en 1 ml/s, een capillair te gebruiken met een inwendige diameter van minder dan 150  $\mu$ m en de afstand tussen het mondstuk en het oppervlak  
35 te beperken tot 2 mm of minder.

35 opbrengen in een atmosfeer die de kans op ontlading, in vergelijking met atmosferische lucht, verkleint.

Derhalve kan, mits een eventuele biologische activiteit van een in de vloeistof aanwezig biologisch deeltje in hoofdzaak niet nadelig wordt beïnvloed, de kans op schade aan

Aldus kan op een beperkt oppervlak met een gedefinieerde grootte vloeistof worden aangebracht.

De werkwijze volgens de onderhavige uitvinding is dan ook, bijvoorbeeld, zeer geschikt voor het gedoseerd aanbrengen van een vloeistof op een object voor het uitvoeren van een analyse. Het object kan bijvoorbeeld een microtiterplaat zijn, een substraat zoals dat kan worden vervaardigd door middel van uit de halfgeleiderindustrie bekende technieken zoals op silicium gebaseerde substraten, en dergelijke.

Voor het uitvoeren van een analyse bevat de vloeistof bij voorkeur een biologisch deeltje gekozen uit een eencellige organisme, een enzym, een probe voor detectie van een nucleïnezuurvolgorde, een enzym, een receptor en een ligand. Overigens is het ook denkbaar om kleine meercellige organismen en weefsels met de vloeistof op te brengen, mits de binnendiameter van het capillair dit toelaat.

Als probe voor detectie van een nucleïnezuurvolgorde wordt met voordeel gebruik gemaakt van een oligonucleotide, zoals in het vak welbekend. Onder een receptor wordt in de onderhavige aanvraag een eiwit verstaan dat specifiek een ligand kan herkennen. Een dergelijke receptor kan bijvoorbeeld een membraanreceptor zijn. Volgens een zeer gunstige uitvoeringsvorm is de receptor een antilichaam. Met voordeel is ten minste het gekozen deel van het oppervlak van het substraat ingericht om het biologische deeltje covalent te koppelen.

Volgens een gunstige uitvoeringsvorm wordt het opbrengen uitgevoerd in een atmosfeer die althans nagenoeg verzadigd is met damp van de vloeistof.

Hierdoor wordt de kans op Rayleigh-opbreking van geladen druppeltjes verkleind, en daarmee wordt bevorderd dat er geen vloeistof buiten het gekozen deel van het oppervlak terecht komt.

Volgens een verdere uitvoeringsvorm geschiedt het opbrengen in een atmosfeer die de kans op ontlading, in vergelijking met atmosferische lucht, verkleint.

Derhalve kan, mits een eventuele biologische activiteit van een in de vloeistof aanwezig biologisch deeltje in hoofdzaak niet nadelig wordt beïnvloed, de kans op schade aan

het substraat worden verkleind door het gebruik van, bijvoorbeeld, een aan stikstof verarmde atmosfeer. De atmosfeer omvat bij voorkeur een ten opzichte van lucht relatief verhoogd gehalte van één of meer gassen met een relatief hoge elektronenaffiniteit. Zo omvat de atmosfeer geschikt  $\text{SF}_6$  of een verhoogd gehalte aan  $\text{CO}_2$ .

Een zeer belangrijke uitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding wordt gekenmerkt doordat na het aanbrengen van de vloeistof op het gekozen deel van het oppervlak, het substraat en het mondstuk ten opzichte van elkaar worden bewogen in een vlak dat in hoofdzaak loodrecht op de as van het capillair staat, en een tweede gekozen deel van het oppervlak van vloeistof wordt voorzien, welk tweede gekozen deel niet overlapt met het eerst van vloeistof voorziene gekozen deel.

In plaats daarvan, of daarenboven, wordt bij voorkeur een array van capillairen toegepast, waarbij de capillairen op een zodanige onderlinge afstand van elkaar zijn geplaatst, dat de gekozen oppervlakken waarop door twee naburige capillairen vloeistof wordt aangebracht niet overlappen.

Met behulp van dergelijke werkwijzen kan het substraat worden voorzien van een groot aantal niet-overlappende gekozen delen, waardoor het mogelijk wordt om veel assays tegelijk uit te voeren.

Volgens een eerste uitvoeringsvorm wordt de tegenelektrode gevormd door het substraat.

In een dergelijk geval omvat het substraat een geleider of halfgeleider, of zijn deze op het substraat aangebracht.

Volgens een alternatieve uitvoeringsvorm wordt als de tegenelektrode een elektrode toegepast welke het gekozen deel van het oppervlak in hoofdzaak omgeeft en nabij het oppervlak wordt gehouden. In de onderhavige aanvraag wordt onder de term "nabij het oppervlak" tegen of op afstand van het oppervlak verstaan, met dien verstande dat in het laatste geval de tegenelektrode zich gebruikelijk op minder dan de helft van de afstand tussen het uiteinde van het capillair en het substraat bevindt.

Deze uitvoeringsvorm heeft als voordeel dat niet-geleidende substraten, zoals bijvoorbeeld microtiterplaten van polystyreen, met behulp van de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding van vloeistof kunnen worden voorzien.

5 Hierbij kunnen de substraten met verhoogde concentraties van, bijvoorbeeld, antilichamen en dus snel worden bekleed, zonder dat dit gepaard gaat met verhoogde kosten als gevolg van verspilling van uitgangsmateriaal. Er worden immers slecht kleine volumina vloeistof op het oppervlak aangebracht.

10 Volgens een interessante uitvoeringsvorm wordt de hoeveelheid aangebrachte vloeistof gemeten aan de hand van stroom- en/of spanningskarakteristieken.

Aldus kan de dosering van vloeistof in de tijd worden gevolgd.

15 Volgens een voorkeursuitvoeringsvorm ligt het debiet tussen 1 pl/s en 1 nl/s, en bij voorkeur tussen 10 en 100 pl/s.

20 Dergelijke debieten zijn zeer geschikt voor het aanbrengen van minuscule hoeveelheden vloeistof op een zeer klein deel van het oppervlak van het substraat. Hierbij kan worden gedacht aan een deel met een oppervlak van 1 mm<sup>2</sup> of minder, en in het bijzonder 0,1 mm<sup>2</sup> of minder.

25 Volgens een gunstige uitvoeringsvorm is bij het aanbrengen van vloeistof op een klein gekozen deel met een oppervlakte van 1 mm<sup>2</sup> of minder de afstand tussen het mondstuk en het oppervlak 200 tot 1000 µm.

Volgens een gunstige uitvoeringsvorm wordt het gekozen deel van het oppervlak begrensd door een middel voor het zich over het oppervlak verspreiden van de vloeistof.

30 Aldus wordt het verkrijgen van een in hoofdzaak homogene vloeistoflaag op het gekozen deel bevorderd en wordt de kans verkleind dat vloeistof buiten het gekozen deel terecht komt.

35 Volgens een eerste uitvoeringsvorm wordt een substraat met op het oppervlak een putje toegepast en het gekozen deel de bodem van het putje omvat, waarbij het zich verspreiden van de vloeistof over het oppervlak door een wand van het putje wordt beperkt.

Volgens een tweede uitvoeringsvorm wordt als middel

voor het verhinderen van het zich verspreiden van de vloeistof over het oppervlak gebruik gemaakt van een barrière gekozen uit i) een hydrofiele barrière en ii) een hydrofobe barrière. Bij een polaire vloeistof wordt dan een hydrofobe barrière gebruikt, en bij een a-polaire een hydrofiele.

Verder kan als middel een geladen barrière worden toegepast met een lading die qua teken hetzelfde is als die van de op het oppervlak aangebrachte vloeistof.

De onderhavige uitvinding zal thans worden toege-  
licht aan de hand van de tekening, waarin

fig. 1 een inrichting weergeeft voor het uitvoeren van de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding; en

fig. 2 een detail van een alternatieve uitvoeringsvorm weergeeft.

In fig. 1 is een capillair 1 weergegeven met een eerste uiteinde 2 en een tweede uiteinde 3. Het eerste uiteinde 2 is aangesloten op een 25 microliter Hamilton injectiespuit 4. Deze injectiespuit 4 bevat de op een substraat A op te brengen vloeistof, in het onderhavige geval 0,3 M NaCl in een ethyleenglycol-watermengsel (70/30 vol.%/vol.%). De plunjer 5 van de injectiespuit 4 wordt in de weergegeven uitvoeringsvorm bewogen door een Harvard PHD 2000 infusiepomp 6 (Antec, Leiden, Nederland). Deze infusiepomp 6 transporteert de vloeistof B naar het distale uiteinde 3 van het capillair 1. Het hier gebruikte capillair 1 heeft een binnendiameter van 110  $\mu\text{m}$  en een buitendiameter van 210  $\mu\text{m}$ . Bij de hier weergegeven uitvoeringsvorm is het capillair 1 van metaal.

Het in fig. 1 schematisch weergegeven substraat A is een halfgeleidend silicium micro-array met 25 putjes, welke zijn gevormd door middel van nat etsen, onder gebruikmaking van in de halfgeleiderindustrie welbekende technieken. De putjes waren rechthoekig met zijden van 200  $\mu\text{m}$ . De diepte was 20  $\mu\text{m}$ . Het (half)geleidende substraat A rust op een metalen plaat 7. Het capillair 1 is via een metalen houder 8, waarin ook meer dan een capillair kan zijn opgenomen, verbonden met de positieve elektrode van een hoogspanningsbron 9 (HCN 12500, Air Parts, Alphen aan de Rijn, Nederland).

Vanaf het distale uiteinde 3 van het capillair 1 kan

middels de door voedingsbron 9 aangelegde hoogspanning van bijvoorbeeld 1 - 2 kilovolt de oppervlaktespanning worden overwonnen waardoor uiterst kleine druppeltjes vanaf het uit tweede uiteinde 3 naar het substraat A, en in het bijzonder een daarin aangebracht putje C worden getransporteerd. Een putje kan met meer dan één vloeistof worden gevuld, waardoor in een zeer klein reactievolume een assay kan worden uitgevoerd.

Vóór het aanleggen van het potentiaalverschil wordt overtollige vloeistof rond het distale uiteinde 3 verwijderd. In fig. 2 is te zien hoe een deel van het een substraat A wordt bedekt met vloeistof. Het distale uiteinde 3 van het capillair 1 (een buitendiameter van 210  $\mu\text{m}$  en een binnendiameter van 110  $\mu\text{m}$ ) bevond zich op een afstand van 400 - 450  $\mu\text{m}$  tot het oppervlak van het substraat A. Er werd een spanning van 1,45 kV aangelegd en het debiet van de pomp was 50 pl/s. Bij 2 - 40 seconden verstuiwen was de diameter van het met vloeistof bedekte deel van het oppervlak 300 - 350  $\mu\text{m}$ . In tabel I zijn meetgegevens weergegeven voor een debiet van 150 en 300 pl/s. Bij een lange verstuiwingsduur gaat de dunne vloeistoflaag op het gekozen deel over in een druppel zonder dat dit een nadelige invloed heeft op het verstuiwen en er treedt geen doorslag op.

Tabel I Diameter van het gekozen deel in  $\mu\text{m}$

Debiet 300 pl/s				
Afstand [ $\mu\text{m}$ ]	450	400	350	300
Conuslengte	262.5	236.25	236.25	225.75
Afstand* [ $\mu\text{m}$ ]	187.5	163.75	113.75	74.25
Pot.verschil [Kv]	1.34	1.29	1.22	1.22
Diameter [ $\mu\text{m}$ ]	450	390	340	300
Debiet 150 pl/s				
Afstand [ $\mu\text{m}$ ]	450		350	300
Conuslengte [ $\mu\text{m}$ ]	236.25		262.5	220.5
Afstand* [ $\mu\text{m}$ ]	213.75		87.5	79.5
Pot.verschil [Kv]	1.34		1.2	1.2
Diameter [ $\mu\text{m}$ ]	350		280	240

\* Tussen tip van de vloeistofconus aan het capillair en substraattooppervlak



Gekozen delen van het oppervlak van het substraat A kunnen ook met een oligonucleotide probe worden bekleed. In de onderhavige uitvinding wordt onder een oligonucleotide probe elk nucleïnezuurpolymeer verstaan met een lengte welke geschikt is voor het selectief hybridiseren met een complementaire RNA- of DNA-streng in een te onderzoeken monster.

Het is voor de vakman duidelijk dat diverse andere in het vak algemeen bekende werkwijzen voor het uitvoeren van assays met de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding kunnen worden uitgevoerd. Zo kunnen de gekozen delen ook worden voorzien van al dan niet verschillende (monoclonale) antilichamen, die een te detecteren antigeen (of scala van antigenen) kunnen herkennen. Ook kunnen tezamen met de vloeistof reagentia, zoals een enzymsubstraat of een middel voor het aantonen van een gevormd complex, worden opgebracht, zoals voor de vakman duidelijk is. Ook zal, indien wordt gewenst het biologische deeltje te immobiliseren, een voor het op te brengen biologische deeltje in het vak bekend daarvoor geschikt substraat worden gebruikt. Dit oppervlak kan het deeltje al dan niet covalent binden. Voor niet-covalente immobilisatie van nucleïnezuren kan bijvoorbeeld een goudoppervlak worden toegepast.

De tegenelektrode kan de vorm hebben van een in zichzelf gesloten structuur waarvan het middelpunt bij projectie op het oppervlak in hoofdzaak samenvalt met het van vloeistof te voorziene deel van het oppervlak. Indien de tegenelektrode zich niet op het oppervlak van het substraat bevindt, of daar tegen wordt gehouden, en zich derhalve tussen het substraat A en het tweede uiteinde 3 van het capillair 1 bevindt, zal het oppervlak van de doorsnede van de tegenelektrode in het algemeen kleiner zijn dan de oppervlakte van het gekozen deel. De tegenelektrode zal in de meeste gevallen een ringvormige elektrode zijn, maar ook anders gevormde, in het bijzonder vierkante tegenelektroden zijn denkbaar. Bij het gebruik van een niet met het substraat verbonden tegenelektrode zal de tegenelektrode in het algemeen vast, bij voorkeur op afstand van het tweede uiteinde 3 instelbaar, op niet geleidende wijze met het capillair 1 zijn verbonden. Dit vergemakkelijkt het reproduceerbaar aanbrengen

van vloeistof wanneer een spanning over het tweede uiteinde 3 en de tegenelektrode wordt aangelegd.

Indien de vloeistof op niet-ronde delen van het oppervlak moet worden aangebracht, verdient het aanbeveling gebruik te maken van een capillair en/of een tegenelektrode met een overeenkomstige niet-ronde vorm. De tegenelektrode kan daarbij een niet-vlakke tegenelektrode zijn. Bij een dergelijke tegenelektrode is de afstand van elk punt van de elektrode tot het distale uiteinde 3 van het capillair 1 in hoofdzaak constant.

Het is denkbaar dat niet het capillair 1 met de voedingsbron is verbonden, doch dat de spanning tussen het tweede uiteinde 3 en de tegenelektrode op andere wijze wordt aangelegd. Zo kan bijvoorbeeld in de op te brengen vloeistof een elektrode (niet weergegeven) zijn gebracht, welke als eerste elektrode op de hoogspanningsbron is aangesloten en de tweede elektrode door het substraat wordt gevormd.

Een dergelijke uitvoeringsvorm kan in het bijzonder nuttig zijn wanneer een array van capillairen wordt toegepast, welke elk met een eigen spanning worden bedreven. Ook kunnen in een dergelijk geval de injectiespuiten individueel door een pomp worden bedreven. Indien het risico bestaat dat aanliggende capillairen elkaar zouden beïnvloeden, kan de afstand tussen de capillairen ook groter zijn, zoals 2 keer zo groot, en kunnen de delen van het oppervlak die niet door een capillair worden bestreken na een geschikte translatie van het array of het substraat van vloeistof worden voorzien.

Bij gebruik van meer dan één capillair, kan het teken van de spanning tussen een eerste capillair en het substraat tegengesteld zijn aan die tussen een aanliggend capillair en het substraat. In het bijzonder kan dan ook één gekozen deel van het oppervlak met twee (of meer) capillairen worden gevuld. Hierdoor wordt de verspreiding van vloeistof buiten het gekozen deel verder beperkt. Dit betreft zowel de verspreiding van verstoven vloeistof alsmede van reeds opgebrachte vloeistof. De neutralisatie betekent ook dat geen of minder ladingtransport door het substraat noodzakelijk is, hetgeen het scala aan substraten dat zonder losse tegen het oppervlak te houden elektrode kan worden gebruikt, verder

vergroot. In de hier geschetste situatie kan het gunstig zijn als de capillairen niet parallel met elkaar verlopen maar een hoek maken. Zij zijn bij voorkeur beide naar het midden van het gekozen deel gericht. Het (bij voorkeur tegelijk) benut-  
5 ten van twee (of meer) capillairen voor het aanbrengen van vloeistof op een gekozen deel, biedt ook diverse mogelijkheden voor het uitvoeren van reacties tussen in de door de capillairen aangevoerde verschillende vloeistoffen. In het bijzonder wordt hierbij gewezen op de uitstekende menging van  
10 de vloeistoffen die kan worden bereikt met de werkwijze volgens de uitvinding.

De met de werkwijze volgens de uitvinding op te brengen vloeistof(fen) moet over een toereikende geleidbaarheid bezitten, zoals in het vak welbekend. De vloeistof kan,  
15 zoals hierboven aangegeven, reagentia bevatten, maar ook reagentia op dragers of dragers waarop reagentia moeten worden aangebracht. Zo kan met de werkwijze volgens de uitvinding op een gekozen deel van het substraat bijvoorbeeld een colloïdale oplossing van goud, latex en dergelijke worden  
20 opgebracht. Van dergelijke materialen is bekend dat het uitstekende dragers zijn voor nucleïnezuur-probes en antilichamen.

Naast het variëren van de spanning voor het aan- en uitschakelen van het verstuiiproces, kan in plaats daarvan of  
25 tegelijk ook de afstand tussen capillair en substraat worden vergroot. Dit gebeurt bij voorkeur in korte tijd, zoals een onderdeel van een seconde. Gebleken is dat door het vergroten van de afstand de vorm van de vloeistofconus niet wezenlijk verandert en vloeistof reproduceerbaar kan worden opgebracht.

30 Voor een reproduceerbaar opstartgedrag, en om in het algemeen om de controle over het opbrengen te maximaliseren, kan het wenselijk zijn informatie te verkrijgen over de vloeistofmeniscus aan het tweede uiteinde 3. Dit kan op diverse wijzen geschieden, bijvoorbeeld door het meten van de  
35 capaciteit (onder gebruikmaking van een op de hoogspanningsgelijkspanning gesuperponeerde wisselspanning) of langs optische weg. In het laatste geval kan met voordeel gebruik worden gemaakt van het feit dat de vloeistofmeniscus van vorm verandert. Zo kan via het eerste uiteinde 2 licht in het

10

capillair 1 worden gekoppeld, welk capillair 1 als golfgelei-  
der fungeert. Door meting van de hoeveelheid door de meniscus  
gereflecteerd licht kan dit als parameter worden gebruikt  
voor het bedienen van de pomp en het onderzoeken van het  
5 opstartgedrag (de eerste vorming van microdruppeltjes). Dit  
gedrag zal afhangen van de toegepaste vloeistof en daarin  
opgenomen stoffen zoals zouten.

CONCLUSIES

1. Werkwijze voor het gedoseerd aanbrengen van een vloeistof op een gekozen deel van het oppervlak van een substraat, waarbij de vloeistof met een debiet tussen 0,01 pl/s en 1 ml/s naar een distaal uiteinde van een capillair wordt gevoerd, waarbij het distale uiteinde een naar het oppervlak gekeerd mondstuk omvat, de inwendige diameter van het capillair minder dan 150  $\mu\text{m}$  is, de afstand tussen het mondstuk en het oppervlak minder dan 2 mm is, en een de oppervlaktespanning van de vloeistof overwinnende spanning wordt aangelegd tussen het mondstuk en een tegenelektrode tot de gewenste hoeveelheid vloeistof op het gekozen deel van het oppervlak is aangebracht.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat als substraat een object voor het uitvoeren van een analyse wordt toegepast.

3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat de vloeistof een biologisch deeltje bevat gekozen uit een eencellige organisme, een enzym, een probe voor detectie van een nucleïnezuurvolgorde, een enzym, een receptor en een ligand.

4. Werkwijze volgens conclusie 3, met het kenmerk, dat als de receptor een antilichaam wordt gebruikt.

5. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het debiet tussen 1 pl/s en 1 nl/s, en bij voorkeur tussen 10 en 100 pl/s ligt.

6. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat de afstand tussen het mondstuk en het oppervlak 200 tot 1000  $\mu\text{m}$  is.

7. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het gekozen deel van het oppervlak wordt begrensd door een middel voor het beperken van het zich over het oppervlak verspreiden van de vloeistof.

8. Werkwijze volgens conclusie 7, met het kenmerk, dat een substraat met op het oppervlak een putje wordt toegepast en het gekozen deel de bodem van het putje omvat, waarbij het zich verspreiden van de vloeistof over het oppervlak

door een wand van het putje wordt beperkt.

9. Werkwijze volgens conclusie 7 of 8, met het kenmerk, dat als middel voor het verhinderen van het zich verspreiden van de vloeistof over het oppervlak gebruik wordt gemaakt van een barrière gekozen uit i) een hydrofiele barrière en ii) een hydrofobe barrière.

10. Werkwijze volgens één van de conclusies 7 tot 9, met het kenmerk, dat als middel een geladen barrière wordt toegepast met een lading die qua teken hetzelfde is als die van de op het oppervlak aangebrachte vloeistof.

11. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het opbrengen wordt uitgevoerd in een atmosfeer die althans nagenoeg verzadigd is met damp van de vloeistof.

12. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het opbrengen wordt uitgevoerd in een atmosfeer welke de kans op ontlading, in vergelijking met atmosferische lucht, verkleint.

13. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat na het aanbrengen van de vloeistof op het gekozen deel van het oppervlak, het substraat en het mondstuk ten opzichte van elkaar worden bewogen in een vlak dat in hoofdzaak loodrecht op de as van het capillair staat, en een tweede gekozen deel van het oppervlak van vloeistof wordt voorzien, welk tweede gekozen deel niet overlapt met het eerst van vloeistof voorziene gekozen deel.

14. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat een array van capillairen wordt toegepast, waarbij de capillairen op een zodanige onderlinge afstand van elkaar zijn geplaatst, dat de gekozen oppervlakken waarop door twee naburige capillairen vloeistof wordt aangebracht niet overlappen.

15. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat de tegenelektrode wordt gevormd door het substraat.

16. Werkwijze volgens één van de conclusies 1 tot 13, met het kenmerk, dat als de tegenelektrode een elektrode wordt toegepast welke het gekozen deel van het oppervlak in hoofdzaak omgeeft en nabij het oppervlak wordt gehouden.

13

17. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat de hoeveelheid aangebrachte vloeistof wordt gemeten aan de hand van stroom en/of spanningskarakteristieken.

fig. 1.

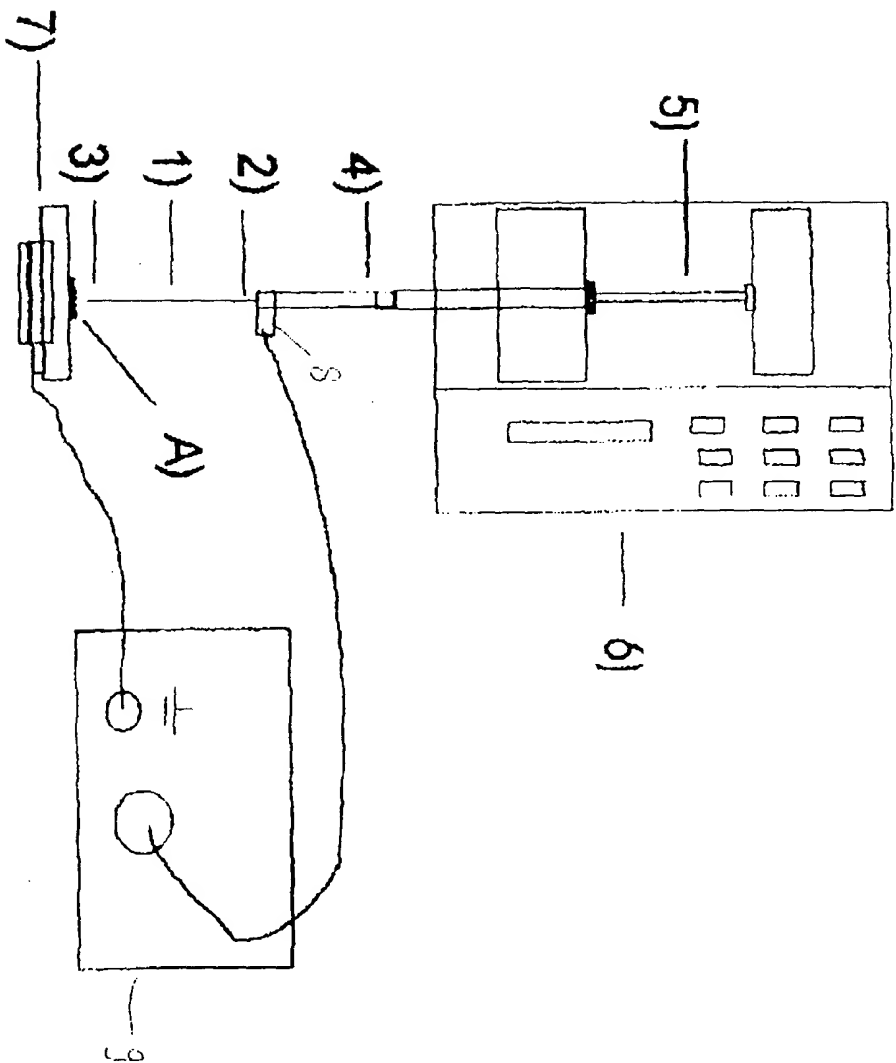
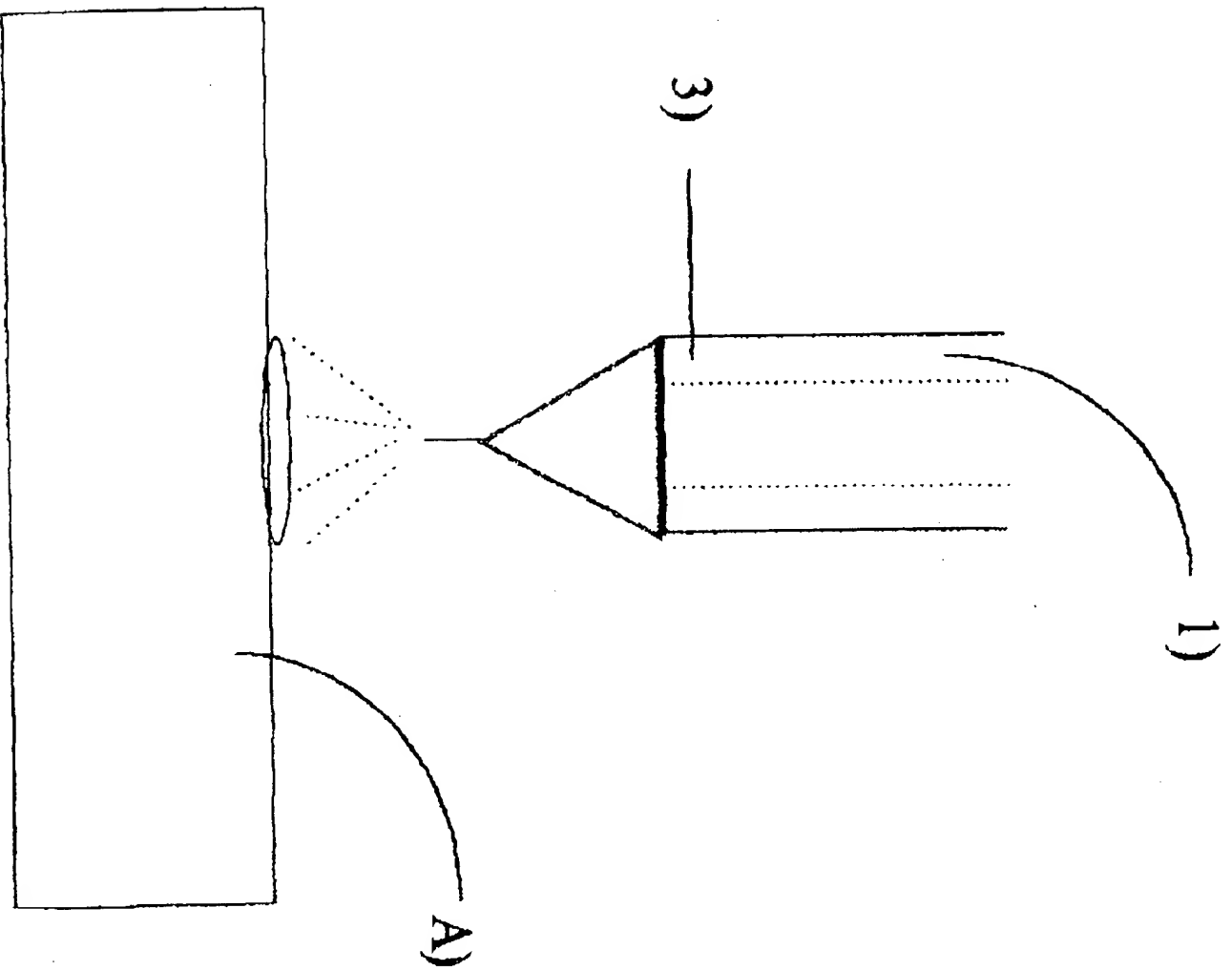




fig. 2.



1  
2  
3  
4  
5

6  
7  
8  
9  
10